

蛋白導入システム“Protein Transduction System”を利用した プロテインセラピーの発展と現状について — 悪性脳腫瘍に対する蛋白導入法の利用を中心に —

道上宏之^{a,b,c*}, 富澤一仁^b, 魏 范研^b, 松下正之^b, 陸 雲飛^b, 市川智継^a,
田宮 隆^d, 松井秀樹^b, 伊達 勲^a,

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a神経病態外科学, ^b細胞生理学
^cカリフォルニア大学サンディエゴ校医学部 細胞分子医学教室, ^d香川大学医学部 脳神経外科

キーワード：プロテインセラピー, 悪性脳腫瘍, p53, エンドソーム, 蛋白導入ドメイン

はじめに

悪性脳腫瘍, 特に神経膠芽腫は現在でも非常に治療困難な腫瘍の一つであり, 様々な治療の施行によっても生存期間中央値は一年以下と報告されている¹⁾. 神経膠芽腫に対する治療結果は, 実質的には25年前と比較してほとんど改善していない²⁾. これは, 脳腫瘍が脳というきわめて重要な場所に発生するため正常脳組織を含む広範囲切除を行うことが困難であることに起因する. 今後, 神経膠芽腫に対する治療法として腫瘍細胞を特異的に殺傷し, 正常細胞を傷つけない治療法を確立することが重要である. 伝統的な抗癌剤や放射線を使用した癌治療では, 腫瘍細胞だけを殺傷することは困難であり, より腫瘍特異的治療の必要性が高まっている. 例えば, ある特定の蛋白や蛋白-蛋白の相

互作用が腫瘍細胞の中で変化し制御不能となっている場合, その目的の蛋白や蛋白-蛋白の相互作用を特異的に調節することは非常に魅力的な癌治療戦略になると考えられる. 現在, これらの治療が遺伝子治療として発展を遂げているが, いくつかの臨床治験の中では治療効果と並行してそれ以上の副作用が問題となっている³⁻⁵⁾. 最近, 蛋白導入システム (Protein Transduction System) を用いて, 直接ペプチドや蛋白全体, また蛋白の機能性ドメインのみを細胞へ導入する手法が広まっており, 癌治療へ応用できるのではないかと注目を集めている. 特に岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学では新しい細胞膜通過ドメインを発見し, 同神経病態外科学との共同研究にて, 神経膠芽腫に対する新しい治療法開発の基礎研究を行なっている.

蛋白導入システム

1. ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1型 TAT 蛋白の研究

蛋白導入システムにおいて重要な役割をする蛋白導

平成18年10月受理

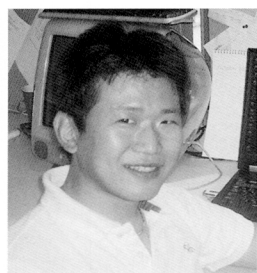
*〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経病態外科学

電話：086-235-7336 FAX：086-227-0191

E-mail：hiro-michi1582@syd.odn.ne.jp

◆ プロフィール ◆



道上 宏之

平成11年, 岡山大学医学部卒, 脳神経外科 (現神経病態外科学) 入局. 平成14年より脳神経外科 田宮隆助教授・市川智継助手の下で悪性脳腫瘍に対する治療研究を始め, 共同研究先である細胞生理学教室 富澤一仁助教授の指導の下, 蛋白導入システムを用いた悪性脳腫瘍細胞増殖抑制の研究を行なう. 長期安定型 p53蛋白の作成 (FEBS Letter) や, 蛋白導入後の細胞内トラフィッキングを改善させるインフルザヘマグルチニンドメインを併用した p53蛋白導入 (JBC) など p53蛋白を利用した研究を中心に行い, JBC (学位論文) や FEBS Letter. などへ論文発表を行なう. また, 平成17年第3回キャンパスベンチャーグランプリ CHUGOKU にて「蛋白質による細胞機能制御とその実用化」にて準グランプリを獲得し, 研究分野に留まることなく更なる応用へ向けた取り組みを行なっている. 平成17年より, 蛋白導入ドメインの生みの親であるカリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) Steven F. Dowdy 先生の下に留学を行いさらなる蛋白導入法の研究応用を行なっている. 現在 Howard Hughes Medical Institute (HHMI) Research Associate となる.

入ドメイン (Protein Transduction Domain: PTD) の代表的ペプチドである TAT ドメインはヒト免疫不全ウイルス (HIV)-1 型の TAT 蛋白より発見された。TAT 蛋白は転写開始や遺伝子組込み反応に重要な long terminal repeat (LTR) に必要であり、ウイルスの複製に不可欠な蛋白である⁶⁾。1988年、Green と Loewenstein のグループ⁷⁾ならびに Frankel と Pabo⁸⁾のグループが、培養細胞内において細胞外に添加した TAT 蛋白が細胞内のウイルスプロモーターの転写を活性化させるという結果を報告した。1991年に Mann と Frankel のグループが外因性の TAT 蛋白が培養細胞条件下にてレセプターを介さずに細胞内に導入されたことを報告した⁹⁾。

2. 蛋白導入ドメインの発見と発展

TAT 蛋白のアミノ酸配列 1-72や37-72のドメインと化学的に結合させたβガラクトシダーゼ蛋白が細胞内へ導入された¹⁰⁾。さらに、Nagahara と Dowdy らはアミノ酸配列47-57 (YGRKKRRQRRR) の11個のアミノ酸からなる現在の TAT ドメインと融合させた蛋白が細胞内へ導入され、細胞機能を制御することを証明した¹¹⁾。これが蛋白導入ドメインを使った蛋白導入システムの礎と考えられる。その後、単純ヘルペスウイルスの VP22蛋白¹²⁾、ショウジョウバエの転写因子の一つである Antennapedia 蛋白¹³⁾より蛋白導入ドメインが発見された。いずれの蛋白導入ドメインにも塩基性アミノ酸であるリジン (K) やアルギニン (R) が多く含まれることが特徴であるとされた。また、Matsushita らにより人工的に合成されたポリアルギニンドメイン (11R) が開発され、他の蛋白導入ドメインと比較して、非常に高い導入を認めた¹⁴⁾。

3. 蛋白導入のメカニズム

当初は、細胞観察時細胞固定に使用するアルコールやパラフォルムアルデヒドの効果により細胞表面に付着している蛋白が導入されているとの指摘があったが、その後、生細胞状態での観察や転写活性の測定などにおいても導入が確認された。導入のメカニズムとしては、塩基性アミノ酸を多く含む蛋白導入ドメインはプラスの電荷を帯びているため、細胞膜表面の負電荷を帯びたヘパラン硫酸プロテオグリカンに接着し、その後 Lipid-raft と呼ばれるコレステロール豊富な部位より細胞内へエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにて取り込まれる。導入後マクロピノソームに局在することが報告されている¹⁵⁾。

4. 蛋白導入システムの問題点と解決法

投与した蛋白が細胞内に十分導入されているにもかかわらず十分に活性を示していない理由の一つに、マクロピノソーム内での蓄積という問題があった。マクロピノソーム内に貯留し、よりわずかにしか放出されないため見た目の投与量と比較して低い活性しか示さなかった¹⁶⁾。これを解決すべく我々は、癌抑制遺伝子 p53蛋白に蛋白導入ドメインとエンドソーム放出ドメインの二つのドメインを付けた蛋白を作成した。エンドソーム放出ドメインとは、エンドソーム内が pH5 程度と非常に低い pH を示していることに着目し、pH7では作用を示さないが、pH5になると膜破壊作用を有するインフルエンザのヘマグルチニンサブユニットの一つ INF7である。この二つのドメインを併用した p53蛋白は、蛋白導入ドメインのみの p53蛋白と比較し1/100低濃度にて悪性脳腫瘍細胞の腫瘍増殖抑制効果を示した¹⁷⁾。また、細胞質内蛋白導入後のもう一

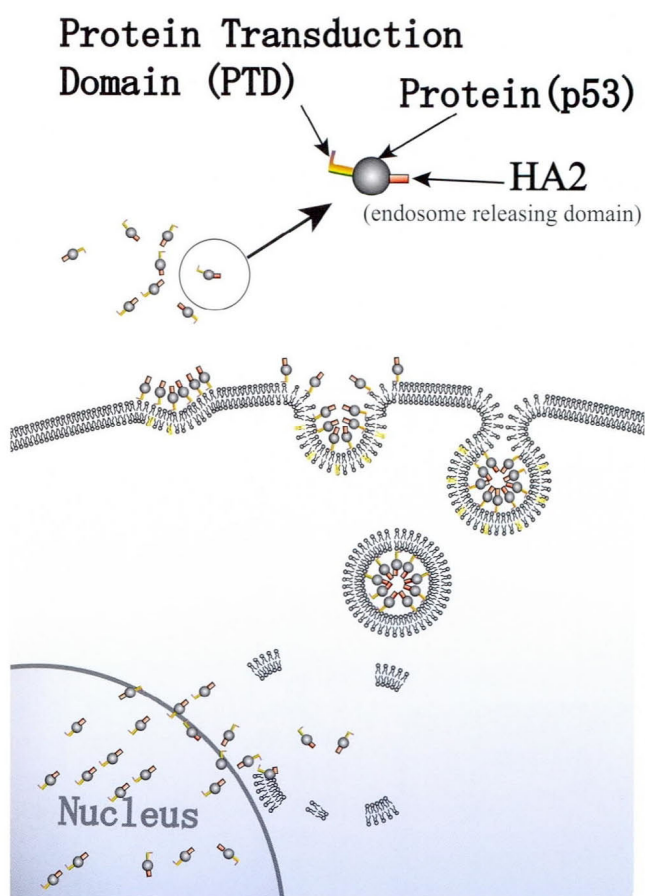


図1 蛋白導入ドメインにより細胞内導入後の p53蛋白が、エンドソーム放出ドメインによりエンドソームより放出された核に移行している。

つの問題点として，導入蛋白の分解という点がある。ウイルスを使った遺伝子治療と異なり，外因性の蛋白を導入する蛋白導入システムを使用した治療においては当初に投与した蛋白が時間経過とともに減少していく。細胞内に導入された p53 はポリユビキチン化されプロテアソームより速やかに分解される。そこで我々は，p53 蛋白の C 末端部分にあるユビキチン結合部位の 6 つのリジン基をアルギニン基に変異させユビキチン抵抗性 p53 蛋白を作成した。これに蛋白導入ドメインを付加したユビキチン抵抗性 p53 蛋白は通常の 5 倍以上長く細胞内に発現し，毎日投与が必要であった野生型 p53 蛋白と比較し 4 日間を一回の投与にて細胞増殖抑制効果を示した¹⁸⁾。臨床応用に向けて改善しないといけない点は数々あるが，蛋白の修飾や他のドメインの併用に展望が開きつつあると思われる (図 1)。

蛋白導入システムを用いた in vivo における研究

1. 悪性腫瘍に対して

悪性腫瘍に対して行なわれている蛋白導入システムを利用した in vivo の実験がいくつか報告されている。P53 の C 末端部分のペプチドは正常細胞に対しては障害を有さず，癌細胞特異的な細胞増殖抑制効果が報告されていた。p53 の C 末端ペプチドに蛋白導入ドメインを付加し，マウス癌細胞腹腔内播種モデルにこのペプチドを腹腔内投与した。この際，通常の L アミノ酸合成したペプチドでは分解が早いためにその光学異性体の D アミノ酸を用いて合成した。この分解抵抗性を持つ抗腫瘍性ペプチドを蛋白導入システムにて導入し，長期の生存効果を認めた¹⁹⁾。

Simone と Klaus のグループは，TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TNF-related apoptosis-inducing ligand: TRAIL) に蛋白導入ドメインを付加したペプチドを頭蓋内脳腫瘍モデルマウスに定位的脳内投与を行なった。このリガンドはデスレセプターを介して腫瘍特異的に作用し，腫瘍の体積を減少させ生存日数を延ばした²⁰⁾。

2. 虚血に対して

脳虚血・脳梗塞や心筋虚血・心筋梗塞などに対する蛋白導入システムを利用した研究の報告が増えている。以前より脳虚血による NMDA レセプターの活性化が c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を引き起こし神経細胞死原因となっているとされていた。そこでの JNK 結合蛋白より取り出した 20 アミノ酸と蛋

白導入ドメインを融合させたペプチドを競合的阻害薬としてラット中大脳動脈閉塞モデル投与した。治療モデルと治療を受けていないモデルでは閉塞後脳梗塞サイズに有意な差が認められた^{21,22)}。

また，NMDA レセプターの活性の下流をターゲットとする研究も報告されている。虚血時，NMDA レセプターは NO 産生や細胞死を引き起こす細胞内 PSD-95 蛋白と相互作用することが知られている。Aarts らのグループは，NMDA レセプター誘導ペプチドと蛋白導入ドメインを融合させたペプチドを培養初代神経細胞に投与し NMDA レセプター依存性のアポトーシスを抑制することを確認した。その後，このペプチドを経静脈投与することでラットの中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞部位の縮小と神経症状の改善を認めた²³⁾。

3. 炎症に対して

炎症性疾患に対して用いられる，ステロイドや NSAIDs は非常に効果的であるが，病気の原因となっている炎症のみを特異的に抑制しないために様々な副作用を引き起こすことが問題とされている。Ras や PI3 キナーゼの活動によって引き起こされるマウス喘息モデルに対し，Myou S. らのグループは PTD 融合のドミナントネガティブの TAT-DN-H-Ras や Class IA の PI3 キナーゼの regulatory subunit p85alpha より作った TAT-DN-E85 を全身投与することにより，IL5 や他の抗原によって惹起される好酸球やリンパ球の気道内への浸潤を抑制した。それにより，気道内の抗原に対する過敏症症状をモデルマウス内で抑制し，肺組織内でのリン酸化 Akt を特異的に抑制していることを証明した²⁴⁾。また，NF- κ B が炎症における中心的な調節因子であることが発表されている²⁵⁾。NF- κ B を特異的にラット炎症モデルにおいて抑制する報告として，Clohisy らは NF- κ B を抑制し，安定した構造を持つ I κ B 蛋白と TAT を融合させた，TAT-I κ B 蛋白を精製し，関節炎が発症しているリュウマチマウスモデルに対し全身投与を行い，特異的に炎症のみを抑制しその他の副作用を呈さなかったと報告している²⁵⁾。

おわりに

現在，蛋白導入システムを利用した基礎研究や臨床応用への研究は非常に発展している分野である。現在臨床試験がされているウイルスベクターやナノパーティ

クルを用いた遺伝子導入法と比較しても、蛋白導入法は非常に高いレベルにまで発展している。しかしながら、導入効率や細胞内外の蛋白の安定性など解決しなければいけない問題も多く残っている。遺伝子導入法と蛋白導入法を比較するだけの研究は終り、いかにしてこの方法を利用するかという局面にきていると考えられる。ウイルスベクターなどを用いて遺伝子を“Transfection”する方法と、蛋白導入法を用いて蛋白を“Transduction”する方法の両方を我々は長所を生かしながら活用することにより質の高い研究および臨床応用への道が開かれると考えられる。

文 献

- 1) DeAngelis LM : N Engl J Med (2001) **344**, 114-123.
- 2) DeAngelis LM : N Engl J Med (2005) **352**, 1036-1038.
- 3) ESGT : French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). J Gene Med (2003) **5**, 82-84.
- 4) T Reid, R Warren, D Kirn : Intravascular adenoviral agents in cancer patients : lessons from clinical trials. Cancer Gene Ther (2002) **9**, 979-986.
- 5) R Vile, D Ando, D Kirn : The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer : unique biological and biosafety points to consider. Cancer Gene Ther (2002) **9**, 1062-1067.
- 6) J Sodroski, R Patarca, C Rosen, F Wong-Staal, S Haseltine : Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. Science (1985) **229**, 74-77.
- 7) M Green, P Loewenstein : Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein. Cell (1988) **55**, 1179-1188.
- 8) A Franckel, C Pabo : Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. Cell (1988) **55**, 1189-1193.
- 9) D Mann, A Frankel : Endocytosis and Targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. EMBO J (1991) **10**, 1733-1739.
- 10) S Fawell, J Seery, Y Daikh, C Moore, L Chen, B Pepinsky and J Barsoum : Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proc Natl Acad Sci USA (1994) **91**, 664-668.
- 11) H Nagahara, AM Vocero-Akbani, EL Snyder, A Ho, DG Latham, NA Lissy, M Becker-Hapak, SA Ezhevsky and SF Dowdy : Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells : TAT-p27Kip1 induces cell migration. Nat Med (1998) **4**, 1449-1452.
- 12) A Phelan, G Elliot and P O'Hare : Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. Nat Biotechnol (1998) **16** (1998), 440-443.
- 13) A Joliot, C Pernelle, H Deagostini-Bazin and A Prochiantz : Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proc Natl Acad Sci USA (1991) **88**, 1864-1868.
- 14) Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li ST, Terada H, Matsui H : A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. J Neurosci (2001) **21**(16), 6000-6007.
- 15) Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF : Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. Nat Med (2004) **10**(3), 310-315.
- 16) Takenobu T, Tomizawa K, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Lu YF, Matsui H : Development of p53 protein transduction therapy using membrane-permeable peptides and the application to oral cancer cells. Mol Cancer Ther (2002) **1**(12), 1043-1049.
- 17) Michiue H, Tomizawa K, Wei FY, Matsushita M, Lu YF, Ichikawa T, Tamiya T, Date I, Matsui H : The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. J Biol Chem (2005) **280**(9), 8285-8289.
- 18) Michiue H, Tomizawa K, Matsushita M, Tamiya T, Lu YF, Ichikawa T, Date I, Matsui H : Ubiquitination-resistant p53 protein transduction therapy facilitates anti-cancer effect on the growth of human malignant glioma cells. FEBS Lett (2005) **579**(18), 3965-3969.
- 19) Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, Dowdy SF : Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. PLoS Biol (2004) **2**(2).
- 20) Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM : Nat Med (2002) **8**, 808-815.
- 21) Hosotani R, Miyamoto Y, Fujimoto K, et al. : Trojan p16peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice. Clin Cancer Res (2002) **8**, 1271-1276.
- 22) Borsello T, Clarke PGH, Hirt L, et al. : A peptide inhibitor of c-Jun N terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. Nat Med (2003) **9**, 1180-1186.
- 23) Aarts M, Liu Y, Liu L, et al. : Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. Science (2002) **298**, 846-850.
- 24) Myou S, Leef Ar, Myo S, et al. : Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. J Exp Med (2003) **198**(10), 1573-1582.
- 25) Clohisy Jc, Roy BC, Biondo C, et al. : Direct Inhibition of NF- κ B Blocks Bone Erosion associated with inflammatory arthritis. J Immunol (2003) **171**(10), 5547-5553.